

证 明

15/3
GR00/03460
4

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 1999 09 08

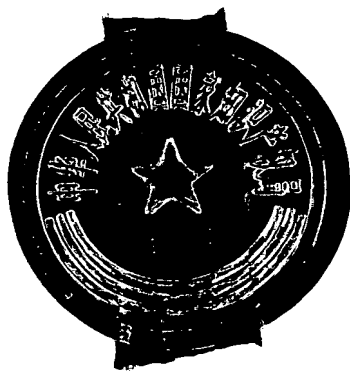
申 请 号： 99 1 16851.8

申 请 类 别： 发明专利

发明创造名称： 重组天然和新型人胰岛素及其制备方法

申 请 人： 中国科学院上海生物化学研究所

发明人或设计人： 冯佑民； 梁镇和； 张友尚； 唐月华； 王燕； 陈晖； 史民；
王琼庆； 郭占云； 刘滨； 朱尚权； 许英镐



PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

姜颖

2000 年 9 月 15 日

权 利 要 求 书

4

1.一种重组人胰岛素,其特征在于与天然人胰岛素相比去除了B1氨基酸残基。

2.一种重组人胰岛素,其特征在于与天然人胰岛素相比,B链第12位上的氨基酸残基是除Val之外的任意氨基酸,即[B12X]人胰岛素。

5 3.根据权利要求2所述的重组人胰岛素,其中B链第12位上的氨基酸残基是Thr,即[B12Thr]人胰岛素。

4.一种重组人胰岛素,其特征在于与天然人胰岛素相比,B链第16位上的氨基酸残基是除Tyr之外的任意氨基酸,即[B16X]人胰岛素。

10 5.根据权利要求4所述的重组人胰岛素,其中B链第16位上的氨基酸残基是Ala,即[B16Ala]人胰岛素。

6.一种重组人胰岛素,其特征在于与天然人胰岛素相比,B链第26位上的氨基酸残基是除Tyr之外的任意氨基酸,即[B26X]人胰岛素。

7.根据权利要求6所述的重组人胰岛素,其中B链第26位上的氨基酸残基是Ala,即[B26Ala]人胰岛素。

15 8.一种制备重组人胰岛素的方法,它包括:

以含有人胰岛素目的基因的质粒为模板,通过PCR扩增法得到酵母交配因子和人胰岛素目的基因片段;

将目的基因片段克隆到甲醇酵母质粒pPIC9中,得到整合质粒;

20 将整合质粒用合适的内切酶线性化,用原生质球法转化甲醇酵母,使质粒整合到宿主的染色体中;

用抗生素和点杂交的方法筛选出高拷贝高表达的工程菌;

利用所得的工程菌发酵,得到重组人胰岛素前体;

分离和纯化前体;

利用胰蛋白酶转肽,得到重组人胰岛素终产物。

25 9.根据权利要求8所述的方法,其中的目的基因是经过定点诱变的。

10.根据权利要求9所述的方法,其中的定点诱变是利用“缺口双链DNA”法进行的,该方法中使用的是以下引物:用于制备NHI-1的5' GGG GTA TCT CTA GAT AAA AGA GTT AAC CAA CAC TTG 3';用于制备NHI-3的5' TGA GGC TTT GNN YTT GGT TTG CG 3',其中的N是G、A、T、C中的任意核苷酸,Y是C和G中任意一个;用于制备NHI-4的5' GAA AGA GGT TTC TTC NNY ACT CCT AAG GC 3',其中的N是G、A、T、C中的任意核苷酸,Y是C和G中任意一个。

11.根据权利要求8所述的方法,其中用限制性胰蛋白酶水解获得去B30的重组人胰岛素。

说明书

重组天然和新型人胰岛素及其制备方法

5 本发明涉及分子生物学和生物化学工程。具体地说，本发明涉及利用重组DNA法生物合成胰岛素。

10 糖尿病是严重威胁人类身体健康的三大疾病之一，其致死率仅次于心血管及肿瘤疾病，居第三位。根据中华医学会糖尿病学会的报告，在1993年估计我国糖尿病患者占人口的1-2%(中华医学会糖尿病学会(1993)，中国糖尿病杂志，1: 57)，到1996年统计则上升为3.21%(向红丁，等(1998)，中国糖尿病杂志，6: 131)，已接近发达国家的5%。胰岛素是治疗糖尿病的特效药物，用于临床已近80年。随着生物技术的发展，重组人胰岛素已逐渐取代从动物胰脏中提取的动物胰岛素。由于在治疗中使用胰岛素的剂量约为mg水平，而细胞因子则多为 μg 水平；因此需要提高重组人胰岛素的表达水平，降低成本以满足社会需求，尤其是发展中国家人民的需求。此外，随着医疗事业的发展，临床上对胰岛素的治疗学性能提出了越来越多的要求。目前临床使用的多为人胰岛素悬浮液，其中包含胰岛素单体的多种聚合形式，甚至包括更大的结晶体，其缺点在于显效慢，而单体形式的胰岛素则具有速效的优点，所以尤其为临床所需求。

20 目前，在工业上是用大肠杆菌和酿酒酵母表达体系生产重组人胰岛素。作为蛋白质表达系统，前者表达水平高但后处理难，后者后处理较简便但表达水平低。甲醇酵母*Pichia pastoris*表达体系兼有以上两种表达体系的优点，具有严格调控的强启动子，表达水平高，生产成本低，易于高密度生长和扩大规模生产，并具有真核细胞表达的长处，如蛋白质的正确折叠和翻译后的体内加工等(Clare, J. J., et al (1991), Bio/Technology, 9: 455, Cregg, J. M., et al (1993), Bio/Technology, 11: 905)。但是，目前还没有利用甲醇酵母来生产重组人胰岛素的有关报道。

30 所以，本发明的目的在于提供新型的人胰岛素：去B1人胰岛素(新型人胰岛素1, NHI-1)，[B12X]人胰岛素(新型人胰岛素2, NHI-2)，[B16X]人胰岛素(新型人胰岛素，NHI-3)，[B26X]人胰岛素(新型人胰岛素4, NHI-4)。

本发明的目的还在于提供新的用于制备重组人胰岛素的方法，具有高表达、后处理简单、得率高等优点。

为了达到本发明的上述及其它目的优点，本发明主要采用了以下技术方案。

6

本发明提供一种新型重组人胰岛素(NHI-1), 其特征在于与天然人胰岛素相比去除了B1氨基酸残基。

本发明提供一种新型重组人胰岛素(NHI-2), 其特征在于与天然人胰岛素相比, B链第12位上的氨基酸残基是除Val之外的任意氨基酸, 所以又称[B12X]人胰岛素。其中以[B12Thr]人胰岛素为佳。

本发明提供一种新型重组人胰岛素(NHI-3), 其特征在于与天然人胰岛素相比, B链第16位上的氨基酸残基是除Tyr之外的任意氨基酸, 所以又称[B16X]人胰岛素。其中以[B16Ala]人胰岛素为佳。

本发明提供一种新型重组人胰岛素(NHI-4), 其特征在于与天然人胰岛素相比, B链第26位上的氨基酸残基是除Tyr之外的任意氨基酸, 所以又称[B26X]人胰岛素。其中以[B26Ala]人胰岛素为佳。

本发明还提供了一种新的制备重组人胰岛素的方法, 它包括: 以含有人胰岛素(HI)目的基因的质粒为模板, 例如利用本实验室构建的pHI/PGK穿梭质粒, 通过PCR扩增法(Maniatis T., et al (1989), Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory)得到酵母交配因子和HI目的基因片段; 利用标准方法(Maniatis T., et al (1989), 同上)将目的基因片段克隆到甲醇酵母质粒pPIC9中, 得到整合质粒; 将整合质粒用合适的内切酶例如BglII线性化, 用原生质球法(Maniatis T., et al (1989), 同上)转化甲醇酵母, 例如GS115菌株, 使质粒整合到宿主的染色体中(Cregg, J. M., et al (1985), Mol. Cell. Biol., 5: 3376); 用抗生素(Scorer, C. A., et al (1994), Bio/Technology, 12: 181)和点杂交的方法(Clare, J. J. et al (1991), Gene, 105: 205)筛选出高拷贝高表达的工程菌; 利用所得的工程菌在合适的发酵条件下发酵, 得到胰岛素前体; 分离和纯化前体; 利用胰蛋白酶转肽, 得到人胰岛素终产物。

为了获得本发明中的新型重组人胰岛素, 整合质粒中的目的基因是经过定点诱变的。本发明的定点诱变是利用“缺口双链DNA”法(李亦平, 等 (1987), 生物工程学报, 3: 90)进行的。为此, 本发明分别设计和合成了以下引物: 用于制备NHI-1的5' GGG GTA TCT CTA GAT AAA AGA GTT AAC CAA CAC TTG 3'; 用于制备NHI-2的引物可参见文献(Wang, Q.-Q., et al (1996), Biochem. Mol. Biol. Int., 39: 1245); 用于制备NHI-3的5' TGA GGC TTT GNN YTT GGT TTG CG 3', 其中的N是G、A、T、C中的任意核苷酸, Y是C和G中任意一个; 用于制备NHI-4的5' GAA AGA GGT TTC TTC NNY ACT CCT AAG GC 3', 其中的N是G、A、T、C中的任意核苷酸, Y是C和G中任意一个。

在本发明的上述方法中, 还可以用限制性胰蛋白酶水解来替代胰蛋白酶转肽,

由胰岛素前体获得去B30的重组人胰岛素。

根据氨基酸分析，本发明的重组去B1人胰岛素不同于重组天然人胰岛素，是一种完全新的蛋白质分子。已知去B1牛胰岛素保留了90%的胰岛素活力 (Brandenburg, D. (1969) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 350: 741)，其结晶形状与天然人胰岛素完全相同，发明人据此推断，去B1人胰岛素的活力保留率应不低于90%。根据现有文献和本发明发明人对胰岛素结构的研究发现，胰岛素一级结构中的个别氨基酸残基与胰岛素单体间的聚合倾向密切相关，其中包括B12、B16和B26位的氨基酸残基。所以，本发明对以上3个位点进行了定点诱变，得到本发明的新型的[B12X]、[B16X]和[B26X]重组人胰岛素。它们的单体间聚合倾向明显减弱，与常规胰岛素相比，在较高浓度下仍然能够保持单体形式(参见后文实施例9)。同时，它们保留了较高的人胰岛素生物活性，其中[B12Thr]人胰岛素保留56%的受体结合能力和几乎全部体内生物活性(Wang, Q.-Q., et al (1996), Biochem. Mol. Biol. Int., 39: 1245)，[B16Ala]人胰岛素保留了17%的受体结合能力和约50%的体内生物活性，[B26Ala]人胰岛素保留了50%的受体结合能力和全部体内生物活性。其中的受体结合能力和体内生物活力是本实验室按照常规方法测定的，这些方法都有文献记载，并且在本领域技术人员已知范畴内。

由于本发明将甲醇酵母用于重组人胰岛素的制备，所以，如后文实施例所述，具有高表达、后处理简单的优点。使得低成本、高密度、大规模生产重组人胰岛素成为可能。尤其是，本发明还独特地用胰蛋白酶限制性水解代替常规的胰蛋白酶转肽来从胰岛素前体制备去B30胰岛素，使后加工更简单，可进一步提高胰岛素的得率。

以下将结合附图对本发明作更为详细的说明。

图1. *Pichia pastoris* 整合质粒pHI/AOX1的构建流程。

图2. HPLC一步法分离纯化表达产物HI的前体，峰*为HI的前体。

图3. HI前体转肽反应物的HPLC图谱，峰*为转肽产物[B30Thr(But)-OBut]人胰岛素。

图4. HI前体和HI的PAGE图谱，1. HI前体 (*S. cerevisiae* 表达产物); 2. HI (*S. cerevisiae* 表达产物); 3. HI前体 (*P. pastoris*表达产物); HI (*P. pastoris* 表达产物)。

图5. HI前体质谱分析。

图6. HI结晶。

图7. HI与人胎盘细胞膜胰岛素受体的结合，○：人胰岛素(*P. Pasroris*表达产物)，□：标准人胰岛素。

图8. HI前体的胰蛋白酶限制性水解反应混合物PAGE图谱。

1. 水解反应产物(1a--去B30人胰岛素; 1b--去八肽人胰岛素)
2. 经HPLC纯化的去B30人胰岛素
3. 对照(3a--HI前体; 3b--猪胰岛素)

5 以下实施例说明了本发明的优选实施方式，但对本发明的范围并不构成限制。

实施例1

突变HI基因的克隆

10 本实验室利用加拿大生物工程研究所提供的pVT102-U质粒，按照标准方法 (Maniatis T., et al (1989), 同上) 构建了穿梭质粒pHI/PGK. 利用引物: 5' TCCGGATCCATGAGATTT和3' TGAATTCTTCTAGTTGCAGTAGTTT进行PCR扩增, PCR反应是按照标准方法(Maniatis T., et al (1989), 同上)进行的: 94℃ 30秒 变性, 55℃ 30秒 退火, 72℃ 1分钟 延伸. 共反应30个循环. 得到含HI目的基因的片段, 其5'端和3'端分别带有BamHI和EcoRI酶切位点.

15 对上述pHI/PGK质粒的HI目的基因按照“缺口双链DNA法”(李亦平等 (1987), 生物工程学报, 3: 90)所述进行定点诱变. 简而言之, 其步骤包括: 制备含尿嘧啶的单链pHI/PGK DNA; 设计并合成下文表1中的各寡核苷酸引物, 然后对其进行5'端磷酸化(也可参见Maniatis T., et al (1989), 同上); 用表1所示合适的核酸内切酶消化 pHI/PGK DNA, 电泳分离纯化得到大片段线性双链pHI/PGK DNA, 与前文制得的
20 带尿嘧啶的单链pHI/PGK DNA混合, 构建缺口双链; 取上述缺口双链pHI/PGK DNA与5'磷酸化的本发明引物混合, 反应形成异源双链DNA; 用制得的异源双链 DNA转化大肠杆菌以扩增该双链. DNA测序(Maniatis T., et al (1989), 同上)证明突变正确.

25 按照表1所示, 本发明设计并合成了不同的引物, 并在消化pHI/PGK DNA制备大片段线性双链pHI/PGK DNA供形成缺口双链所需时使用了不同的核酸内切酶, 由此获得相应的含新型重组人胰岛素的的目的基因的质粒, 经上述PCR扩增最终得到突变HI基因片段.

表1

目的突变基因	寡核苷酸引物	核酸内切酶
NHI-1	5'GGG GTA TCT CTA GAT AAA AGA GTT AAC CAA CAC TTG3'	BamHI, HindIII
NHI-2	见Wang等(Wang, Q.-Q., et al (1996), 同上)	XbaII, HindIII
NHI-3	5' TGA GGC TTT GGC TTT GGT TTG CG 3'	XbaII, HindIII
NHI-4	5' GAA AGA GGT TTC TTC GCT ACT CCT AAG GC 3'	XbaII, HindIII

实施例2

工程菌的构建和筛选

将实施例1中制得的HI基因片段和各突变HI基因片段克隆到甲醇酵母质粒pPIC9(购自INVITROGEN)的启动子AOX1之后(Maniatis T., et al (1989), 同上), 分别得到整合质粒pHI/AOX1, pNHI-1/AOX1, pNHI-2/AOX1, pNHI-3/AOX1, pNHI-4/AOX1.

将整合质粒用内切酶BglII线性化, 用原生质球方法转化甲醇酵母*Pichia pastoris*菌株GS115(购自INVITROGEN), 使质粒整合到染色体中(Cregg, J. M., et al (1985), Mol. Cell. Biol., 5: 3376).

用抗生素G418(Scorer, C. A., et al (1994), Bio/Technology, 12: 181)和点杂交方法(Clare, J. J., et al (1991), Gene 105: 205)筛选, 分别得到高拷贝的高表达工程菌YP99/HI(1999年8月8日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心进行了保藏, 保藏号为CGMCC NO. 0413), YP99/NHI-1, YP99/NHI-2, YP99/NHI-3和YP99/NHI-4.

实施例3

重组天然人胰岛素的制备

在15升发酵罐中配制发酵培养液(Laroche, Y., et al (1994), Bio/Technology, 12: 1119). 发酵培养液以无机盐为主要成分, 由基础盐(BSM)和微量盐(PTM1)组成, 参见表2. 将6升含甘油的基础盐发酵培养液加入发酵罐, 蒸汽灭菌后用50%氨水调pH至5.5, 加入过滤灭菌的PTM1, 每升培养液加5 ml PTM1.

表2

基础盐(BSM)		微量盐(PTM1)	
H ₃ PO ₄	26.7 ml/l	CuSO ₄ ·5H ₂ O	6 g/l
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.93 g/l	KI	0.08 g/l
K ₂ SO ₄	18.2 g/l	MnSO ₄ ·H ₂ O	3.0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14.9 g/l	NaMoO ₄ ·H ₂ O	0.2 g/l
KOH	4.13 g/l	H ₃ BO ₃	0.02 g/l
甘油	5%	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.5 g/l
		ZnSO ₄	20.0 g/l
		H ₂ SO ₄	5 ml/l
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	65.0 g/l
		生物素	0.2 g/l

以实施例2中构建的工程菌YP99/HI作为一级种子于50 ml YPG(酵母提取物1%,

polypeptone 2%, 甘油2%)中, 30℃ 摇24小时; 二级种子于200 ml YPG中, 30℃ 摇24小时。取600 ml 二级种子接种于发酵罐中的发酵培养液, 于30℃ 培养24小时, 使之将甘油耗尽。用 50%氨水调pH至5.5, 以补料方式加甲醇进行诱导表达, 1升甲醇加5 ml PTM1, 于30℃ 诱导发酵84小时, 将培养液从罐中放出。放罐时培养液O.D.₆₀₀应为160。

用放射免疫、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE(Schagger, H., et al (1987), Anal. Biochem., 166: 368)和HPLC测定表达产物的浓度, 测得发酵液上清中表达产物HI前体的浓度为200 mg/l。比本实验室以放免法测定的酿酒酵母表达量(约50 mg/l,)高3倍。

实施例4

产物的分离、纯化和鉴定

实施例3得到的培养物经离心去除菌体。取上清液上C-18柱用HPLC一步纯化: C-8半制备柱(1 cm x 25 cm); 流速 2 mg/min; 缓冲液A: 0.1% TFA, 缓冲液B: 0.1% TFA 80% CAN; 梯度: 0-30% 缓冲液 B 20分钟, 30% 30分钟, 30%-80% 40分钟, 80%-0% 5分钟, 见图2。纯化的HI前体经PAGE鉴定为单一条带, 见图3。氨基酸组成(表3)和质谱分子量(图4)与理论值符合。回收率为90%。

表3.HI前体的氨基酸组成

氨基酸	Ve	Vt
Asx	3.08	3
Thr	2.12	2
Ser	3.42	3
Glx	6.73	7
Gly	3.84	4
Ala	(3)	3
Cys	ND	6
Val	3.74	4
Ile	1.96	2
Leu	5.98	6
Tyr	3.84	4
Phe	3.01	3
Lys	1.94	2
His	2.11	2
Arg	0.98	1

Ve: 实验值; Vt: 理论值; ND: 未测定。

实施例5

转肽和重组人胰岛素的鉴定

取实施例4制得的纯化HI前体，溶于DMSO/1,4-丁二醇，得溶液
5 (15:70:15(v/v/v))，加入过量叔丁酯保护的苏氨酸(Thr(Bu^t)-OBu^t)，用浓氨水调pH至6.5，加胰蛋白酶(蛋白质:酶=5:1)于25℃反应6小时，加酸终止反应。反应混合物经HPLC分析，表明有80%的HI前体转化为转肽产物[B30Thr(Bu^t)-OBu^t]HI(图5)。

[B30Thr(Bu^t)-OBu^t]HI经三氟乙酸(TFA)处理，脱去叔丁酯保护基，得到重组人胰岛素(HI)。HI结晶如图6所示。结晶液：1%柠檬酸，0.13%醋酸锌，16%(v/v)丙酮
10 (pH6.0)。

实施例6

纯化新型重组人胰岛素的制备

重复实施例3至实施例5中的步骤，分别用工程菌YP99/NHI-1，YP99/NHI-2，
15 YP99/NHI-3和YP99/NHI-4代替其中的YP99/HI，分别得到纯化的本发明新型重组人胰岛素NHI-1，NHI-2，NHI-3和NHI-4。

实施例7

去B30重组天然或新型人胰岛素的制备。

20 取HI前体冻干粉溶于NH₄HCO₃溶液，加入浓度为1mg/ml的胰蛋白酶(溶解于NH₄HCO₃溶液)，用NH₄HCO₃溶液补足反应体积，使人HI前体终浓度为10mg/ml，25℃反应过夜，图8为反应混合物PAGE图谱。HI前体：胰蛋白酶=200:1(W/W)。NH₄HCO₃浓度为100mM，pH8.0。

按照上述方法，同用本发明的各种NHI前体代替HI前体，就可以得到相应去
25 B30新型重组人胰岛素。

实施例8

HI生物活性测定

取本发明制得的HI测定其与人胎盘细胞膜胰岛素受体的结合能力，结果见图7，
30 以结合率50%计算，HI的受体结合能力与标准人胰岛素相同(冯佑民，等(1982)，生物化学与生物物理学报，14:137)。

用双交叉法测小白鼠血糖降低的方法(见中国药典95版附录XIIG)，测得本发明HI的体内生物活力为27 IU/mg，与标准人胰岛素一致。

实施例9

胰岛素自我聚合能力的测定

用FPLC凝胶过滤方法测定新型重组人胰岛素的自我聚合能力(Brems, D. N., et al (1991), Protein Engin., 5: 527). 凝胶柱: Superdex 75 (HR 10/30). 缓冲液: 磷酸缓冲生理盐水(PBS), pH 7.4. 流速: 0.4 ml/分钟. 样品浓度: 1.20 mg/ml (2×10^{-4} mol/l), 室温, 280 nm检测. 分别以HI和单体胰岛素[B28K,B29P]人胰岛素(Ciszak, E., et al (1995), Structure, 3: 615) 作为胰岛素自我聚合的阳性和阴性对照. HI, [B28K,B29P]人胰岛素, [B12Thr]人胰岛素, [B16Ala]人胰岛素和[B26Ala]人胰岛素在Superdex G75柱上的保留时间列于表4.

表4. 新型重组人胰岛素在Superdex G75柱上的保留时间

样品	保留时间(分)	峰形
HI	36.4	不对称
[B28L,B29P]HI	39.4	对称
[B12Thr]HI (NHI-2)	39.4	对称
[B16Ala]HI (NHI-3)	38.3	对称
[B26Ala]HI (NHI-4)	38.9	对称

根据表4结果, [B12Thr]HI, [B16Ala]HI及[B26Ala]HI均为单体.

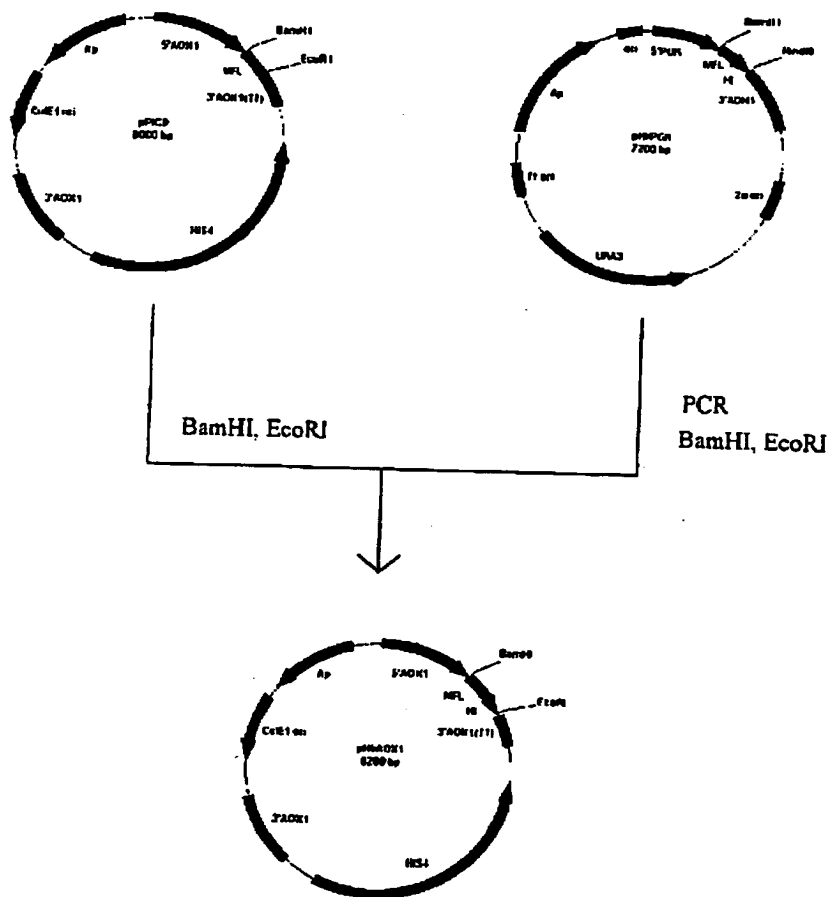


图 1

99.09.17

14

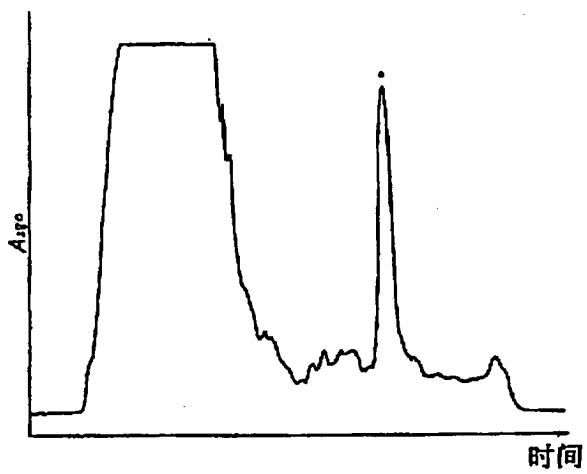


图 2

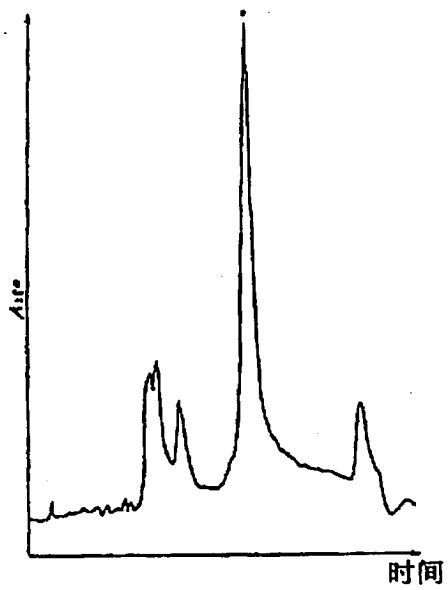


图 3

99-00-1

15



图 4

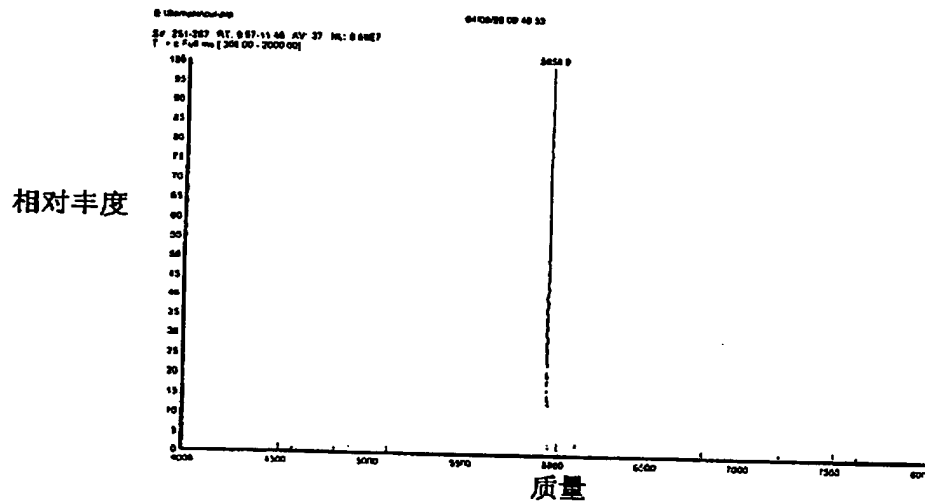


图 5



图 6

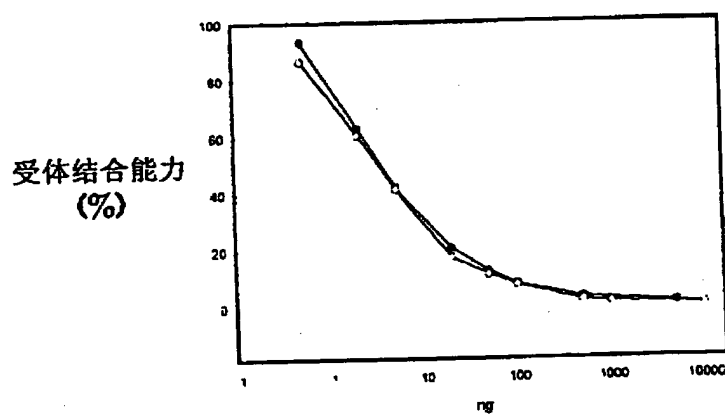


图 7

7

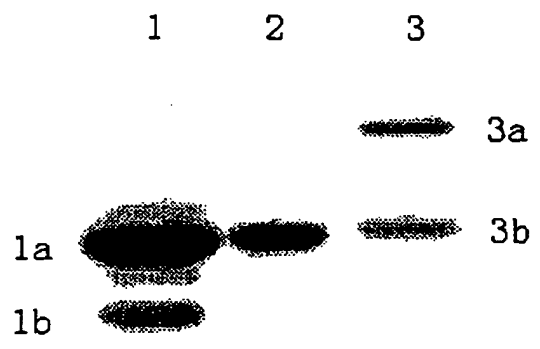


图 8

